

(様式第9 別紙2 : 公開版)

養成技術者の研究・研修成果等

1.養成技術者氏名: 全 崇鍾

2.養成カリキュラム名 : 新規耐熱性酵素の開発とその耐熱化機構の解明

3.養成カリキュラムの達成状況

(1)チオレドキシソ関連酵素

本研究は、高温下で機能する超耐熱性酵素チオレドキシソ、チオレドキシソレダクターゼおよびチオレドキシソペルオキシダーゼに関する研究である。これらのタンパク質は、タンパク質中のジスルフィドの還元による還元型タンパク質の合成反応、過酸化水素等の活性酸素の除去反応等の機能を有しており、酸化型システインの状態では活性を示す消化酵素インヒビタータンパク質の還元によるインヒビター活性の阻害、蛇毒タンパク質のシステイン残基間のS-S結合の除去による無毒化、紫外線照射による皮膚の炎症の予防等の目的で、医薬品として用いることが提案されている。また、食物アレルギーの除去等の目的で食品に添加して用いたり、乾燥や紫外線等に起因する酸化ストレスによる肌荒れの改善剤等の目的で化粧品として用いることが可能である。しかし、固体状態または半固体状態の医薬品、食品及び化粧品等では過滅菌が困難であるため、通常加熱滅菌が行われるところ、従来知られているチオレドキシソは、耐熱性が低い。従って、従来の易熱性のチオレドキシソを医薬品等として用いたり、食品等に添加して用いる場合には、高温での滅菌を行うことができないという難点がある。

また、一般に溶質の水に対する溶解度は温度と共に上昇するため、高温下で機能できる耐熱性のチオレドキシソ、チオレドキシソレダクターゼ及びチオレドキシソペルオキシダーゼを用いることができれば、タンパク質中のジスルフィドの還元による還元型タンパク質の合成反応、過酸化水素等の活性酸素の除去反応等を、高温下で調製した高濃度の基質溶液に該酵素を作用させることにより効率よく行うことができる。

本研究では、高温下で機能できるチオレドキシソ、チオレドキシソレダクターゼおよびチオレドキシソペルオキシダーゼ、これらの酵素をコードする各DNA、これらのDNAを組み込んだ各ベクター、これらのベクターで形質転換された各形質転換体、並びに、これらの各形質転換体を用いた耐熱性チオレドキシソ、耐熱性チオレドキシソレダクターゼ及び耐熱性チオレドキシソペルオキシダーゼの生産し、その機能と性質を解明している。さらに、重合体を形成しているチオレドキシソペルオキシダーゼの性質から、蛋白質の耐熱化には、タンパク質の重合化が必要であることが示唆された。また、熱測定と電子顕微鏡により、これらの構造と機能との相関性をより詳しく解析することができた。

(2) DNA リガーゼ

本研究は、DNA断片の末端を結合させるリガーゼ反応を行なう耐熱性DNAリガーゼに関するものである。DNAリガーゼは2つのDNA断片の末端を結合させるという遺伝子組換え技術の中で不可欠な酵素であるが、従来使用されているものは細菌やファージ由来の酵素であるため、ほとんどのものは熱に対して不安定であり高温下での反応性もない。そのため、超好熱菌から耐熱性DNAリガーゼを得ることで、酵素安定性の向上、および、高温下でのリガーゼ反応を期待できる。最近、耐熱性のDNAリガーゼを用いたLigation chain reaction (LCR)技術も開発され、耐熱性DNAリガーゼを単純なDNAリガーゼ反応に使用するだけでなく、遺伝子変異による病気診断にも利用することも可能になっている。そこで、本研究では、高温下で上記の反応を触媒することができ、さらに高温下でも長時間安定な耐熱性DNAリガーゼを開発することを目的とした。本研究で使用した超好熱性細菌は、好気性好熱性古細菌 アエロパイラム ペルニックス(*Aeropyrum pernix* K1)である。本超好熱性細菌の遺伝子配列から本酵素活性を示すと思われる遺伝子(APE1094)を、PCR反応で増幅し抽出した後、蛋白質発現プラスミド pET-3d に挿入、そのプラスミドを大腸菌 Rosetta(DE3)に組み込み、本酵素の生産をおこなった。生産された酵素は加熱処理およびカラムクロマトグラムで単離精製した。精製された本酵素は、分子量約69kDaのタンパク質で、DNAリガーゼはpH7.5, 50mM トリス塩酸緩衝液中の温度30 - 80 で、本酵素活性が検出された。さらに本酵素分子が安定であるという事から耐有機溶媒性の向上も期待できる。一般に酵素が失活しやすい有機溶媒中あるいは有機溶媒水溶液中において本酵素を用いた生化学反応を行わせることが可能となる。本酵素の利用により、新たなDNA関連反応も期待できる。

4 . 成果(A4版3枚程度)

(1) Thioredoxin and thioredoxin reductase

I have identified and characterized a novel thioredoxin system in the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. The gene (Accession No. APE0641) of *A. pernix* coding a 37-kDa protein contains a redox active site motif (CPHC) but its N-terminal extension region (about 200 residues) shows no homology within the genome database. The gene (APEI061) having high homology to thioredoxin reductase codes a 37-kDa protein with the active site motif (CSVC) and binding sites for FAD and NADPH. I cloned the two genes and expressed both proteins in *E. coli*. It was observed that the recombinant proteins could act as an NADPH dependent protein disulfide reductase system in the insulin reduction. In addition, the protein (APE0641) and thioredoxin reductase from *E. coli* could also catalyze the disulfide reduction. From these results, it was clarified that APEI061 and APE0641 express thioredoxin (*ApTrx*) and thioredoxin reductase (*ApTR*) of *A. pernix*, respectively. *ApTR* is expressed as an active homodimeric flavoprotein in the *E. coli* system. The optimum temperature was above 90 °C, and the half-life of heat inactivation was about 4 min.

at 110 °C. The heat stability of *ApTR* was enhanced in the presence of excess FAD. *ApTR* could reduce both thioredoxins from *A. pernix* and *E. coli* and showed a similar molar specific activity for both proteins. The standard state redox potential of *ApTrx* was about -262 mV, which was slightly higher than that of Trx from *E. coli* (-270 mV). These results indicate that lower redox potential of thioredoxin is not necessary for keeping catalytic disulfide bonds and thereby coping with oxidative stress in an aerobic hyperthermophilic archaea. Furthermore, the thioredoxin system of aerobic hyperthermophilic archaea is biochemically close to the bacteria.

(2) Thioredoxin peroxidase

A gene (APE2278) encoding the peroxiredoxin (Prx) homologous protein of yeast and human was identified in the genome database of the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix*. I cloned the gene and produced the encoded protein in *E. coli* cells. The isolated recombinant protein showed peroxidase activity *in vitro* and used the thioredoxin system of *A. pernix* as an electron donor. These results indicate that the recombinant protein is in fact thioredoxin peroxidase (*ApTPx*) of *A. pernix*. Immunoblot analysis revealed that the expression of *ApTPx* was induced as a cellular adaptation in response to the addition of exogenous H₂O₂ and may exert an antioxidant activity *in vivo*. Analysis of the *ApTPx* oligomers by HPLC and electron microscopic studies showed that *ApTPx* exhibited the hexadecameric protein forming twofold toroid-shaped structure with outer and inner diameters of 14 and 6 nm, respectively. These results indicated that *ApTPx* is a novel hexadecameric protein, composed of two identical octamers. Although oligomerization of individual subunits does not take place through an intersubunit disulfide linkage involving Cys⁵⁰ and Cys²¹³. Cys⁵⁰ is essential for the formation of the hexadecamer. Mutagenesis studies suggest that the sulfhydryl group of Cys⁵⁰ is the site of oxidation by peroxide and that oxidized Cys⁵⁰ reacts with the sulfhydryl group of Cys²¹³ of another subunit to form an intermolecular disulfide bond. The resulting disulfide can then be reduced by thioredoxin. In support of this hypothesis, *ApTPx* mutants lacking either Cys⁵⁰ or Cys²¹³ showed no TPx activity whereas the mutant lacking Cys²⁰⁷ had a TPx activity.

(3) DNA ligase

A gene encoding for a putative ATP-dependent DNA ligase from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1 was cloned and the biochemical characteristics of the resulting recombinant protein was examined. The gene (Accession No. APE1094) from *A. pernix* coding a 69-kDa protein showed a 39 - 61% identity with other ATP-dependent DNA ligases from the archaea. Normally DNA ligase is activated by NAD⁺ or ATP. There has been no report about the other

activators for DNA ligase. The recombinant ligase was a monomeric protein and catalyzed strand joining on a singly nicked DNA substrate in presence of ADP and a divalent cation (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} and Co^{2+}) at high temperature. The optimum temperature and pH for nick closing activity were above 70 °C and 7.5, respectively. The ligase remained stable for 60 min of treatment at 100 °C, and the half-life was about 25 min at 110 °C. This is the first report of a novel hyperthermostable DNA ligase that can utilize ADP to activate the enzyme.

5. 成果の対外的発表等

(1) 発表（論文掲載済、または査読済を対象。）

- Identification and characterization of thioredoxin and thioredoxin reductase from *Aeropyrum pernix* K1. European Journal of Biochemistry Vol. 269, No. 22, Page: 5423-5430 (2002).
- Characterization of Novel Hexadecameric Thioredoxin Peroxidase from *Aeropyrum Pernix* K1. Journal of Biological Chemistry Vol 278, No. 26. Page: 24174-24180 (2003)
- A novel ADP-dependent DNA ligase from *Aeropyrum pernix* K1 Vol. 550, Page: 69-73 (2003)

(2) 口頭発表（発表済を対象。）

- 日本農芸化学会 2003年度（平成15年度）大会の一般講演で発表

(3) 特許等（出願番号を記載）